

(第3号様式)

学 位 論 文 要 旨

氏 名 山 下 美 智 子

論 文 名

Uhrf1 は軟骨細胞分化を制御し正常な骨格形成に必須である

学位論文要旨

【緒言】軟骨分化は様々な転写因子やホルモンにより細かく制御されており、長管骨の長軸成長を担う内軟骨骨化において大変重要である。また、軟骨分化の異常は、骨格形成の障害だけではなく変形性関節症などの病因にもなりうる。エピゲノムは DNA の塩基配列に変化を伴わず、DNA やヒストンへの化学修飾により規定される遺伝情報であり、エピゲノム修飾状態は細胞分裂を経てもなお一部継承される。近年、細胞分裂の際の DNA メチル化維持制御因子である Uhrf1 (Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1) が、癌細胞増殖などに機能を発揮することが報告されている。しかしながら、骨格組織においてはその役割は不明であるため、我々は四肢特異的 Uhrf1 遺伝子欠損マウスを用いて、骨格組織における Uhrf1 の働きについて解析した。

【材料と方法】四肢間葉系細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する (Prx1-Cre) マウスと Uhrf1 flox マウスを交配し、四肢間葉系細胞特異的 Uhrf1KO (*Uhrf1^{ΔLimb/ΔLimb}*) マウス (以下 cKO) を作出した。軟 X 線、マイクロ CT、骨密度測定 (DXA 法)、組織学的染色を用いて表現型の解析を行った。マウス新生仔膝関節由来初代培養軟骨細胞を用いて、軟骨分化マーカー遺伝子の発現を real time RT-PCR にて解析、軟骨基質産生についてアルシアンブルー染色を用いて測定した。また、初代培養細胞を用いて、RNA シーケンスを行い網羅的な遺伝子発現変動解析を行った。

氏名 山下 美智子

【結果】外観の観察では、**cKO** では四肢長が明らかに短く、関節部位での変形を呈していた。大腿骨の骨密度測定では、**cKO** 群において有意な減少を認めた。軟 X 線では **cKO** 群の四肢長管骨長が **Control** 群に比べ、約 **31~40%** の短縮を認めた。また、組織学的解析では **cKO** 群の成長軟骨板細胞の柱状配列に乱れを認め、有意な増殖軟骨の面積の減少および肥大軟骨の幅の増加を認めた。さらに、初代培養軟骨細胞を分化誘導したところ、**cKO** 由来の軟骨細胞では、軟骨基質産生の著明な低下を認めた。そこで、軟骨分化マーカー遺伝子発現変動を調べた結果、軟骨分化主要転写因子である **Sox9** の発現に差を認めないものの、**cKO** 群では、比較的早期の分化マーカーである **Col2a1**、**Col11a1** には発現低下傾向を認めた。一方で、後期分化マーカーである **Col10**、**Runx2** には発現上昇傾向、さらに **Mmp13** には有意な発現上昇がみられた。このことから、**Uhrf1** 遺伝子欠損により軟骨細胞分化が促進され、成長軟骨板における肥大化が進行し、その結果、長管骨長の短縮を認めたと考えられた。次に、**RNA** シーケンスによって網羅な遺伝子発現解析を行ったところ、**cKO** マウスで2倍以上の有意な発現上昇が見られた遺伝子が **324**、1/2 以下の有意な遺伝子発現低下が見られた遺伝子が **98** であった。これらの遺伝子について **gene ontology** 解析を行った。その結果、**Functional annotation** では **glyco protein** や **secreted**、**cell adhesion** などが挙げられた。また、有意な発現上昇が見られた遺伝子についてパスウェイ解析、**biological process** について検索したところ、**Focal adhesion**、**Cell adhesion** に関連する遺伝子群が有意に多く含まれていた。**Gene set enrichment analysis** では、**focal adhesion** のシグナル伝達経路に関わる遺伝子の発現上昇が有意に抽出されており、**real time RT-PCR** を用いたバリデーションでも、**Col5a3**、**Lamb3**、**Itga2**、**and Itga11** などの遺伝子発現上昇が確認できた。これらの **focal adhesion** に関わるシグナルの活性化により軟骨細胞分化に異常が生じ、骨格形成不全が生じる可能性が示唆された。

【考察】今回骨格組織において **Uhrf1** が軟骨分化に重要な役割を果たしているという、非常に興味深い結果が得られた。メチル化の継承は **DNA** の複製時、すなわち細胞増殖の際に起こるため細胞増殖が **cKO** で低下していたことは当然であり、これまでの癌組織などの報告とも一致している。しかしながら、軟骨細胞分化過程における **DNA** の複製時のメチル化の継承という点のみからでは説明することができない。このことから、**Uhrf1** はすでに存在するメチル化の維持のみならず **de novo** の **DNA** メチル化にも関与し、分化に関わる遺伝子の発現調節に寄与している可能性がある。

【結論】**Uhrf1** は軟骨細胞分化において、エピジェネテクス制御を介して転写ネットワークを調整することによって、正常な骨格の成熟に重要な役割を有することが示された。

キーワード (3~5)

Uhrf1, **chondrocyte**, **differentiation**